



УДК 631.46:632.15

© 2009

В. Н. Гришко

## Функционирование некоторых амидогидролаз в черноземе, загрязненном соединениями фтора

(Представлено академиком НАН Украины В. С. Подгорским)

*Досліджено функціонування амідогідролаз (аспарагінази, глутамінази, уреази і аргінази), а також дезаміназ (амідази) в черноземах, забруднених сполуками фтору. Встановлено, що фториди по-різному впливають на ефективність функціонування ферментів, що беруть участь у метаболізмі азотвмісних органічних сполук у ґрунті. Навіть при незначному рівні накопичення фтору спостерігається інгібування процесів дезамінування амідів монокарбонних кислот, гідролітичного розщеплення орнітину і глутаміну. Разом з цим на початкових етапах дії токсиканта відмічена активація процесів перетворення сечовини і аспарагіну. Зі збільшенням тривалості дії фторидів відбувається більш істотно пригнічення біохімічної трансформації сечовини, ніж аспарагіну. Вивчення кінетики процесу ферментативного гідролізу сечовини в ґрунтах за різного рівня фтористоводневої кислоти показало істотні зміни як початкової, так і максимальної швидкості ферментативної реакції.*

Почвенные ферменты являются одной из активных составляющих при рассмотрении вопросов функционирования биологического блока трансформации органического вещества почвой. В настоящее время биология почв решает несколько актуальных проблем, среди которых ведущее место занимает “биология почв и охрана окружающей среды” [1]. Решение последней приобретает особую значимость при изучении функционирования экосистем, формирующихся в крупных промышленных регионах Украины со значительным количеством поступающих токсических соединений, к числу которых относятся фториды [2, 3]. К настоящему времени изучено влияние соединений фтора на состав основных физиологических групп почвенных микроорганизмов черноземов и лесных почв [4–6]. Однако остаются еще недостаточно выясненными вопросы функционирования почвенных ферментов, которые в большинстве своем имеют микробное происхождение и участвуют в биогеохимических потоках в экосистемах и ландшафтах химических элементов, накапливающихся в органической массе. Особую актуальность такого рода исследования представляют для понимания специфики выполнения антропогенно-измененной почвой биогеохимических

функций по мобилизации и передвижению элементов в пищевых цепях (растения — животные — микроорганизмы). В связи с этим автором проведены исследования особенностей функционирования ферментов, которые наряду с аммонификаторами участвуют в процессах трансформации азотсодержащих органических веществ в почве, загрязненной соединениями фтора [6, 7].

Объектами исследований были техногенно-измененные почвы, которые сформировались на различном удалении от источника эмиссий фтора (Запорожский алюминиевый комбинат), чернозем южный (разрез расположен на удалении более чем 40 км от источника эмиссий). В модельных экспериментах использовался чернозем обыкновенный, который фумигировали фтористоводородной кислотой в концентрациях 0,02; 0,2 и 2,0 мг HF/м<sup>3</sup>. Активность аспарагиназы (КФ 3.5.1.1), глутаминазы (КФ 3.5.1.2), амидазы (КФ 3.5.1.4), уреазы (КФ 3.5.1.5) и аргиназы (КФ 3.5.3.1) определяли на 10, 20 и 30-е сутки воздействия токсиканта по общепринятым методикам [8]. Определение некоторых кинетических показателей ферментативной реакции, катализируемой уреазой, проводили по Ф. Х. Хазиеву [8].

В техногенно-нарушенных ландшафтах в составе растительных остатков и микробных клеток в конструкторе поступает значительное количество белковых веществ, аминокислот и других азотсодержащих соединений. В дальнейшем превращении этих веществ значительную роль играют присутствующие в почве протеолитические и дезаминирующие ферменты. В результате процессов последовательного протеолитического расщепления до аминокислот и распада под действием амидогидролаз (аспарагиназы, глутаминазы, уреазы и аргиназы), а также дезаминаз (амидазы) азот белковых веществ минерализуется в доступные для высших растений формы.

Исследование активности почвенных амидогидролаз и дезаминаз показало, что в верхнем слое почвы (0–10 см) зоны сильного загрязнения, который, как было показано в предыдущих работах автора, в наибольшей мере загрязнен фторидами [9], имеет место существенное ингибирование функционирования всех изучаемых ферментов (табл. 1). В наибольшей степени снижается активность амидазы и аргиназы (более чем на 80%), тогда как интенсивность процессов гидролитического расщепления аспарагина снижается на 27% по сравнению с таковыми в зональной почве.

В нижележащих слоях почвы (20–30 см) всех зон загрязнения фторсодержащими промышленными выбросами Запорожского алюминиевого комбината концентрации фтора ниже, чем в верхнем слое, и, как следствие, в меньшей степени проявляется его ингибирующее действие на биохимические процессы трансформации азоторганических соединений. Так, активность аргиназы и амидазы, хотя и по-прежнему статистически достоверно ниже, чем в аналогичном слое зональной почвы, но в 1,5 раза выше, чем в верхнем слое. Такая же закономерность наблюдается и в слое почвы 30–40 см. Несколько иная тенденция характерна для других исследованных амидогидролаз. Так, активность аспарагиназы при снижении уровня содержания фтора в почве статистически достоверно увеличивается более чем на 40% (см. табл. 1).

Для подтверждения предположения о том, что именно фторсодержащие эмиссии предприятия вызывают отмеченные выше закономерности изменения биохимических процессов минерализации азоторганических соединений, выполнены модельные опыты по фумигации почвы фтористоводородной кислотой, которая составляет практически половину всех фторсодержащих выбросов комбината и относится к категории наиболее токсических и реакционно способных соединений фтора. Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что уже при действии минимальной концентрации фтористоводородной

Таблица 1. Активность аргиназы, аспарагиназы и амидазы в почве, загрязненной фторсодержащими выбросами, мг N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/г почвы за 24 ч (M ± m)

Зона загрязнения	Глубина отбора проб, см	Аргиназа			Аспарагиназа			Амидаза		
		M ± m	V, %	t <sub>st</sub>	M ± m	V, %	t <sub>st</sub>	M ± m	V, %	t <sub>st</sub>
Сильного	0-10	0,04 ± 0,001	5,4	45,1	0,54 ± 0,012	5,5	4,8	0,33 ± 0,02	10,7	14,8
	20-30	0,06 ± 0,005	14,8	18,9	1,16 ± 0,062	9,3	4,6	0,5 ± 0,013	4,6	19,7
	40-50	0,05 ± 0,001	4,4	39,9	0,21 ± 0,01	7,9	11,3	0,57 ± 0,009	2,8	5,4
Среднего	0-10	0,06 ± 0,003	9,1	33,0	0,64 ± 0,008	6,7	2,5	0,35 ± 0,008	4,0	67,8
	20-30	0,08 ± 0,01	21,4	7,5	1,11 ± 0,03	8,8	5,1	0,57 ± 0,014	4,3	15,2
	40-50	0,12 ± 0,016	23,0	0,5	0,21 ± 0,01	8,4	11,3	0,54 ± 0,007	2,2	6,9
Зональная почва (чернозем южный)	0-10	0,17 ± 0,002	2,5	—	0,74 ± 0,04	9,4	—	0,9 ± 0,033	6,4	—
	20-30	0,15 ± 0,001	1,5	—	0,75 ± 0,063	14,5	—	0,85 ± 0,012	2,4	—
	40-50	0,13 ± 0,001	1,8	—	0,68 ± 0,04	10,3	—	0,72 ± 0,026	6,1	—

Таблица 2. Активность глутаминазы, аспарагиназы и амидазы в черноземе обыкновенном, фумигированном фтористоводородной кислотой, мг N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/г почвы за 24 ч (M ± m)

Концентрация токсиканта, мг HF/м <sup>3</sup>	Глутаминаза			Аспарагиназа			Амидаза			
	M ± m	V, %	t <sub>st</sub>	M ± m	V, %	t <sub>st</sub>	M ± m	V, %	t <sub>st</sub>	
Контроль	0,046 ± 0,001	0,9	—	0,50 ± 0,003	1,1	—	3,11 ± 0,014	0,8	—	
10-е сутки										
0,02	0,037 ± 0,001	1,3	26,2	0,82 ± 0,004	0,9	63,0	2,28 ± 0,021	1,6	33,0	
0,2	0,032 ± 0,0002	1,6	43,2	0,79 ± 0,002	0,5	72,2	1,87 ± 0,01	0,75	76,2	
2,0	0,026 ± 0,0005	1,4	56,0	0,69 ± 0,002	0,6	51,5	1,61 ± 0,028	3,0	47,2	
20-е сутки										
0,02	0,035 ± 0,001	1,3	23,3	0,67 ± 0,002	0,5	46,1	1,6 ± 0,01	1,0	88,9	
0,2	0,027 ± 0,0002	1,8	51,9	0,65 ± 0,003	0,9	32,8	1,05 ± 0,022	3,6	78,8	
2,0	0,021 ± 0,003	2,2	72,3	0,62 ± 0,003	1,0	28,4	0,83 ± 0,05	9,8	46,7	
30-е сутки										
0,02	0,029 ± 0,001	1,9	50,4	0,60 ± 0,002	0,5	26,41	1,17 ± 0,02	2,5	88,5	
0,2	0,022 ± 0,001	2,2	65,9	0,56 ± 0,003	0,8	14,7	0,53 ± 0,019	6,1	109,7	
2,0	0,016 ± 0,0003	4,2	67,3	0,45 ± 0,003	1,0	10,9	0,33 ± 0,034	17,9	75,0	

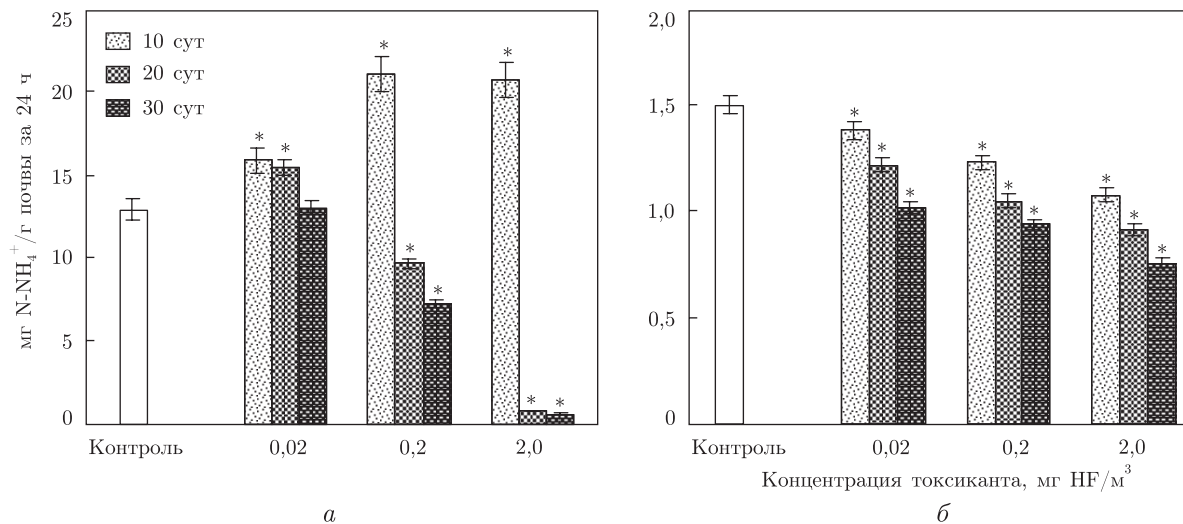


Рис. 1. Активность уреазы (а) и аргиназы (б) в черноземе обыкновенном при действии фтористоводородной кислоты в течение 10, 20 и 30 сут

кислоты проявляются две закономерности в изменении активности изученных ферментов (табл. 2, рис. 1). Первая закономерность связана с уменьшением активности ферментов и характерна для амидазы, глутаминазы и аргиназы. Наиболее значимое ингибирование ферментативной активности на начальном этапе действия токсиканта отмечено для амидазы – более чем на 25% по отношению к контролю, тогда как у глутаминазы и аргиназы – на 20 и 8% соответственно.

С увеличением концентрации токсиканта и длительности его воздействия наблюдается более значительное угнетение процессов превращения сложных азоторганических соединений почвы, катализируемых глутаминазой, амидазой и аргиназой. Уже на 20-е сутки фумигации чернозема обыкновенного фтористоводородной кислотой в минимальной концентрации активность амидазы снижается на 40% по отношению к контролю (см. табл. 2), тогда как аргиназы – на 18% (см. рис. 1, б). Максимальное снижение энзиматической активности наблюдается на 30-е сутки воздействия токсиканта. Так, при фумигации чернозема обыкновенного возрастающими концентрациями токсиканта (0,02; 0,2 и 2,0 мг HF/м<sup>3</sup>) активность амидазы снижается относительно контроля более чем на 50, 60 и 80% соответственно.

Вторая закономерность выражается в повышении активности уреазы и аспарагиназы при определенном уровне поступления токсиканта в почву. Так, на 20-е сутки фумигации чернозема обыкновенного фтористоводородной кислотой в минимальной концентрации активность уреазы увеличивается на 60% по отношению к контролю, тогда как средняя и максимальная концентрации токсиканта обуславливают ее снижение более чем на 20 и 40% соответственно (см. рис. 1, а). Аналогичная закономерность отмечена и для аспарагиназы с той лишь разницей, что ингибирование активности фермента происходит при действии фтористоводородной кислоты в максимальной концентрации в течение 30 сут (см. табл. 2).

При объяснении указанных закономерностей, по мнению автора, необходимо учитывать тот факт, что к снижению активности фермента может приводить не только ингибирующее действие фтора, но и повышение кислотности почвы, которое происходит при поступлении фтористоводородной кислоты. По данным Ф. Х. Хазиева, оптимальной реакцией для уре-

азы в почве является рН 6,5–7,0, а в кислых и сильнощелочных средах уреазы проявляет слабую активность [10]. Повышение активности фермента, очевидно, можно объяснить тем, что фтор принимает участие в процессах тонкой биохимической регуляции функций уреазы и аспарагиназы на уровне конформационных изменений четвертичной структуры белка и активного центра фермента и, как следствие, кинетических характеристик ферментативной реакции.

Для выяснения влияния фтора на протекание реакции, катализируемой уреазой, были рассчитаны кинетические показатели этого процесса, в частности максимальная скорость реакции. При исследовании особенностей кинетики ферментативного процесса установлен оптимальный интервал экспозиции, в котором скорость реакции максимальная и отвечает этапу ее “начальной скорости”. В почвах модельного эксперимента определены оптимальные экспозиции времени для измерения начальной скорости реакции, катализируемой уреазой (табл. 3). Полученные кривые для всех вариантов опыта имеют максимумы при 15 мин инкубации. Установленная экспериментальным путем экспозиция времени использовалась при определении  $V_{\max}$ .

Приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что начальная скорость ферментативной реакции для почвы, фумигированной разными концентрациями токсиканта на протяжении 10 сут, была выше, чем для контрольного варианта, что хорошо согласуется со статистически достоверным увеличением ферментативной активности в этих вариантах опыта. За 24 ч инкубации начальная скорость ферментативной реакции в почве при действии средней концентрации фтористоводородной кислоты снизилась в 25 раз, а высокой — в 18 раз по сравнению с контролем. По-видимому, такое значительное уменьшение начальной скорости реакции за этот временной интервал и обуславливает снижение активности уреазы.

Согласно результатам исследования субстратной зависимости скорости ферментативной реакции, для уреазы субстратное ингибирование имеет место при концентрации субстрата 3,3 М (рис. 2). Выполненный расчет  $V_{\max}$  и  $K_M$  позволяет констатировать, что при действии фтористоводородной кислоты происходит существенное изменение как максимальной скорости, так и ферментативной реакции (см. табл. 3). Так, уже на начальном этапе фумигации повышение активности уреазы сопровождается возрастанием на 30–50% перечисленных выше показателей. Наряду с этим более длительное воздействие токсиканта и

Таблица 3. Активность уреазы при различном времени инкубации и кинетические показатели ферментативной реакции

Концентрация токсиканта, мг HF/м <sup>3</sup>	Активность уреазы (мг N–NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /г почвы за 1 ч) при времени инкубации						$K_M$ , моль	$V_{\max}$
	15 мин	30 мин	1 ч	3 ч	6 ч	24 ч		
Контроль	4,0	2,4	2,2	1,54	0,78	0,54	52,63	10,0
	10-е сутки							
0,02	5,6	3,6	3,1	2,07	1,26	0,66	58,82	10,0
0,2	4,4	3,2	2,8	2,51	1,76	0,88	66,67	15,38
2,0	4,4	4,2	3,4	2,64	2,02	0,86	45,45	13,89
	30-е сутки							
0,02	9,2	3,2	3,0	2,14	1,03	0,54	55,25	12,5
0,2	8,0	3,6	3,2	2,3	1,1	0,6	30,30	11,11
2,0	6,0	4,8	3,5	2,0	1,4	0,03	45,45	7,52

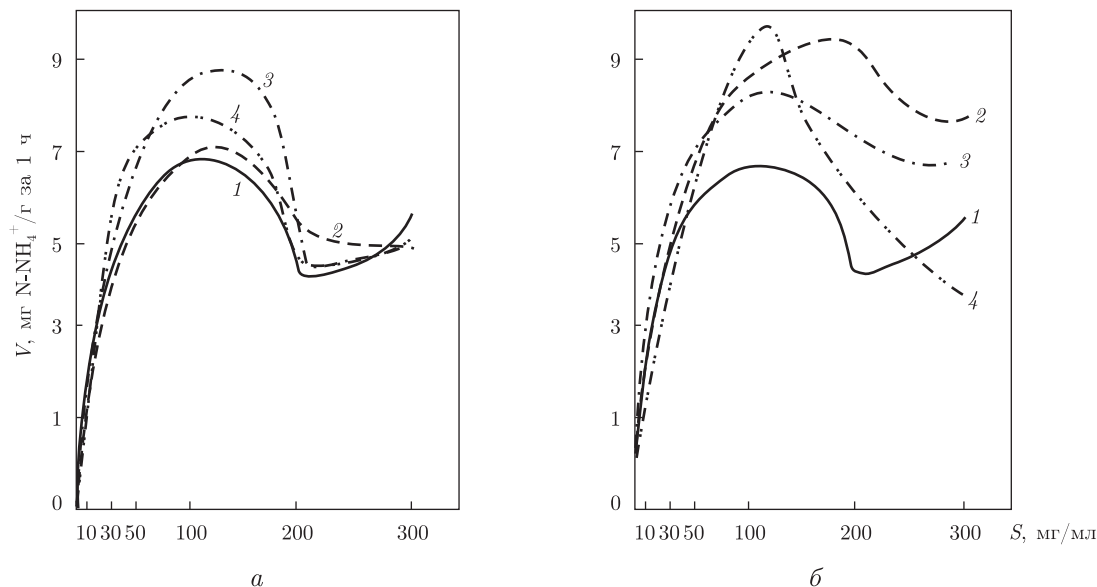


Рис. 2. Кривые зависимости скорости ферментативной реакции, катализируемой уреазой, от концентрации субстрата: *а* — фумигация фтористым водородом в течение 10 сут, *б* — фумигация фтористым водородом в течение 30 сут; 1 — контроль, 2 — при действии 0,02 мг HF/м<sup>3</sup>, 3 — 0,2 мг HF/м<sup>3</sup>, 4 — 2,0 мг HF/м<sup>3</sup>

в максимальной концентрации приводит к снижению на 25% значений  $V_{\max}$  и более чем на 10%  $K_m$ .

Таким образом, исследование интенсивности биохимических процессов в почве, загрязненной фторидами, по изменению активности амидогидролаз (аспарагиназы, глутаминазы, уреазы и аргиназы), а также дезаминаз (амидазы) в черноземах показало, что фториды по-разному воздействуют на эффективность функционирования ферментов, принимающих участие в метаболизме азотсодержащих органических соединений в почве. Даже при незначительном уровне накопления фтора обнаружено ингибирование процессов дезаминирования амидов монокарбоновых кислот, гидролитического расщепления орнитина и глутамин. Наряду с этим на начальных этапах воздействия токсиканта отмечена активация процессов расщепления мочевины и аспарагина. С увеличением количества и времени действия фторидов происходит более значимое угнетение процесса биохимической трансформации мочевины, чем аспарагина. Изучение кинетики процесса ферментативного гидролиза мочевины в почвах при различном уровне воздействия фтористоводородной кислоты позволило установить существенные изменения как начальной, так и максимальной скоростей ферментативной реакции.

1. *Перспективы* развития почвенной биологии: Тр. Всерос. конф., Москва, 22 февр. 2001 г. / Под ред. Д. Г. Звягинцева. — Москва: МАКС Пресс, 2001. — 284 с.
2. Шелепова О. В., Потатуева Ю. А. Агрэкологическое значение фтора // *Агрэхимия*. — 2003. — № 9. — С. 78–87.
3. Помазкина Л. В., Котова Л. Г., Прокофьев А. Ю. и др. Азотный режим в различных типах пахотных почв, загрязненных фторидами алюминиевого производства // Там же. — 2005. — № 12. — С. 59–66.
4. Гришко В. Н. Микробоценоз почв, подверженных загрязнению фторсодержащими промышленными эмиссиями кислого характера // *Микробиология*. — 1998. — № 3. — С. 416–421.
5. Гришко В. Н. Количественный состав некоторых групп почвенных микроорганизмов в экотопах при загрязнении фторидами // *Микробиол. журн.* — 1998. — № 2. — С. 13–21.

6. Евдокимова Г. А., Зенкова И. В., Мозгова Н. П., Переверзева В. Н. Почва и почвенная биота в условиях загрязнения фтором. – Апатиты: Изд-во Кольского науч. центра РАН, 2005. – 155 с.
7. Гришко В. Н. Изменение активности гидролитических ферментов в почвах, загрязненных фторидами // Доп. НАН України. – 1999. – № 9. – С. 194–200.
8. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. – Москва: Наука, 1990. – 192 с.
9. Гришко В. Н. Фториды в почвах геохимической техногенной аномалии // Доп. НАН України. – 1997. – № 10. – С. 132–137.
10. Хазиев Ф. Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. – Москва: Наука, 1982. – 204 с.

Криворожский ботанический сад НАН Украины

Поступило в редакцию 21.04.2009

**V. N. Grishko**

### **Functioning some amidohydrolases in chernozem polluted by fluorine compounds**

*The functioning of amidohydrolases (asparaginase, glutaminase, urease, and arginase) and desaminases (amidases) in chernozem polluted by fluorine compounds is studied. The results testify that fluorides differently affect the functioning efficiency of enzymes that take part in the metabolism of nitrogen-bearing organic compounds in soil. Even at the insignificant level of fluorine accumulation, the inhibition of desaminization of amides of monohydrocarboxylic acids, the hydrolysis of ornithine and glutamine is observed. On the initial stages of the toxicant influence, the activation of the decomposition of urea and asparagine is marked. With increase of the amount and the time of fluorides action, there is a more meaningful suppressing of a biochemical transformation of urea than that of asparagine. The study of the urea zymohydrolysis process kinetics in soils at different levels of the hydrofluoric acid influence allowed setting the substantial changes in both the initial and maximal rates of the enzymatic reaction.*